

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平9-183730

(43) 公開日 平成9年(1997)7月15日

(51) Int.Cl. ⁸	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 31/665	ABE		A 6 1 K 31/665	ABE
	ABC			ABC
	ABD			ABD
	ABF			ABF
	AED			AED

審査請求 未請求 請求項の数 9 O L (全 8 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平8-116395

(22) 出願日 平成8年(1996)5月10日

(31) 優先権主張番号 特願平7-110995

(32) 優先日 平7(1995)5月10日

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(31) 優先権主張番号 特願平7-128125

(32) 優先日 平7(1995)5月26日

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(31) 優先権主張番号 特願平7-285343

(32) 優先日 平7(1995)11月1日

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 000006091
明治製菓株式会社
東京都中央区京橋2丁目4番16号

(72) 発明者 山 口 恵 三
神奈川県横浜市保土ヶ谷区瀬戸ヶ谷町53-102

(72) 発明者 森 川 景 子
島根県出雲市塩治町1361-8

(72) 発明者 荒 明 美奈子
神奈川県横浜市港北区師岡町760番地 明治製菓株式会社薬品総合研究所内

(74) 代理人 弁理士 佐藤 一雄 (外2名)

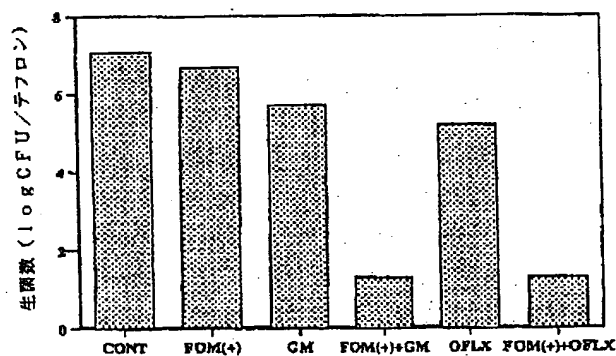
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ホスホマイシン鏡像異性体を含んでなる医薬

(57) 【要約】

【課題】 免疫調節、抗炎症、難治性感染治療、およびバイオフィーム形成阻害に有用な医薬の提供。

【解決手段】 意外にもホスホマイシンの鏡像異性体(エナンチオマー)が実質的に抗菌作用を有さない一方で、免疫調節、抗炎症、難治性感染治療、およびバイオフィーム形成阻害に有用であることが見出された。よって、このホスホマイシンの鏡像異性体またはその塩を含んでなる医薬組成物を免疫調節剤、抗炎症剤、難治性感染症治療剤、およびバイオフィーム形成阻害剤または破壊剤として使用する。



CONT : 対照

FOM(+): ホスホマイシンの鏡像異性体

GM : ゲンタマシン

OFLX : オフロキサシン

【特許請求の範囲】

【請求項1】ホスホマイシンの鏡像異性体またはその塩を含んでなる、医薬組成物。

【請求項2】免疫調節剤である、請求項1記載の医薬組成物。

【請求項3】抗炎症剤である、請求項1記載の医薬組成物。

【請求項4】アレルギー性疾患の治療または予防剤である、請求項1記載の医薬組成物。

【請求項5】難治性感染症治療剤である、請求項1記載の医薬組成物。

【請求項6】バイオフィーム形成阻害剤または破壊剤である、請求項1記載の医薬組成物。

【請求項7】抗菌剤を更に含んでなる、請求項1～6のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項8】ホスホマイシンの鏡像異性体またはその塩1モルに対して、抗菌剤を0.1～5モル含んでなる、請求項7記載の医薬組成物。

【請求項9】前記バイオフィームが、黄色ブドウ球菌、表皮ブドウ球菌、レンサ球菌、緑膿菌、クレブシエラ属、大腸菌、腸球菌、エンテロバクター属、シトロバクター属、またはセラチア属細菌によって形成されたものである、請求項6～8のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の背景】

発明の分野

本発明は、ホスホマイシンの鏡像異性体の医薬用途に関し、より詳細にはホスホマイシンの鏡像異性体の免疫調節剤、抗炎症剤、難治性感染症治療剤、バイオフィーム形成阻害剤としての医薬用途に関する。

【0002】背景技術

ホスホマイシン (fosfomycin) は放線菌の生産する抗生物質として広く知られている (特公昭45-9828号公報)。このホスホマイシンの合成法も確立され、また合成によって得られたラセミ体を光学分割する方法も明らかとなっている (特公昭46-43206号公報および特公昭53-24407号公報)。

【0003】さらに、ホスホマイシンは抗菌作用の他に、免疫調節作用 (特開昭59-98094号公報)、抗アレルギー作用、バイオフィームの関与していると思われる難治性疾患の症状緩解作用など、特殊な作用を有することが見出されている。

【0004】しかしながら、ホスホマイシンがこれら興味ある特殊な作用を有しているにもかかわらず、ホスホマイシンの主作用である抗菌作用の存在により、従来その効果を明確に把握できずにいた。また、上記の特殊な作用の発揮を期待してホスホマイシンを投与する際、それが大量となると菌交代現象などが懸念される。よっ

て、抗菌作用と上記の特殊な作用とが分離できれば興味深い。

【0005】とりわけ、免疫調節の機能については、生体内におけるその機構は非常に複雑であるが、この分野における知識は急速に拡大するとともに、これら生体防御系に作用する免疫調節剤および抗炎症剤は非常に有用であることが認識されてきている (免疫学イラストレテッド、南江堂、1986年3月1日発行参照)。

【0006】よって、免疫調節作用および抗炎症作用を有するより優れた薬剤は常に望まれているといえる。

【0007】更に、近年、抗菌力などの点から最も適した抗菌剤が用いられているにもかかわらず、治療効果がみられない、いわゆる難治性感染症が問題となっている。その難治化要因の一つとしてバイオフィーム (微生物膜) の存在が指摘されている。栄養に乏しい流水中のパイプ内面または岩石表面に細菌が固着、増殖してバイオフィームが形成されることが観察されて以来 (アニュアル・レビュー・オブ・マイクロバイオロジー、35, 29, 1981)、生体組織表面でも細菌がつくるバイオフィームが観察されている (インフェクション・アンド・イミューニティ、43, 359, 1984)。一方、医療機器の領域でも血管内カテーテル等においてバイオフィームが観察されている (キドニー・インターナショナル、35, 614, 1989)。これらの細菌は周辺に多糖体を主成分とするアルジネート (alginate) を産生し、さらにバイオフィームを形成して、薬が膜を通らないようにして生き延びていくものと考えられている (アニュアル・レビュー・オブ・マイクロバイオロジー、41, 435, 1987)。

【0008】生体内での細菌によるバイオフィーム形成が感染症の難治化要因の一つとして捉えるようになった結果、バイオフィームと各種抗菌剤との相互作用が研究の対象されている。しかし今日の時点では、バイオフィームに対し高い透過性を有し、内部の菌を完全に殺菌できうる抗菌剤はまだ見つかっていない。また、バイオフィームを破壊するという補助的療法も完全なものではない。

【0009】一方、緑膿菌性びまん性汎細気管支炎に対し、マクロライド抗生物質であるエリスロマイシン、クラリスロマイシンを長期投与することによる効果が報告され (感染症学雑誌、60, 45, 1986)、クラリスロマイシンは低濃度でグリコカリックス (glycocalyx) の産生を抑制し、組織への付着をも抑制することが観察されている (感染症、21, 161, 1991)。しかし、その作用機構は不明であり、またこれら手法が常に有効であるとも言えないのが現状である。

【0010】よって、ホスホマイシンの有するバイオフィームへの作用を抗菌作用と分離できれば、バイオフィームが関与していると思われる難治性感染症の治療方法の確立に有用であるといえる。

【0011】

【発明の概要】本発明者等は、今般、意外にもホスホマイシンの鏡像異性体（エナンチオマー）が実質的に抗菌作用を有さない一方で、免疫調節、抗炎症、難治性感染治療、およびバイオフィーム形成阻害または破壊に有用であることを見出した。

【0012】従って、本発明によれば、ホスホマイシンの鏡像異性体またはその塩を含んでなる医薬組成物が提供される。

【0013】また、本発明の別の態様によれば、ホスホマイシンの鏡像異性体またはその塩を含んでなる免疫調節剤、抗炎症剤、難治性感染症治療剤、およびバイオフィーム形成阻害剤または破壊剤が提供される。

【0014】

【発明の具体的説明】

ホスホマイシンの鏡像異性体

ホスホマイシンの鏡像異性体、すなわち（+）（*cis*-1,2-epoxypropyl）phosphonic acid）は、特公昭46-43206号公報および特公昭53-24407号公報記載の製法に従い容易に得ることができる。

【0015】また、ホスホマイシンの鏡像異性体は塩の形で使用されるのが好ましく、塩の形態としてはナトリウム塩、カルシウム塩、トロメタモール塩等の薬理学的に許容される塩があげられる。なお、本明細書において、単にホスホマイシンの鏡像異性体とは、特に断らない限り、その塩を含む概念として用いる。

【0016】ホスホマイシン鏡像異性体の効能・効果

ホスホマイシンの鏡像異性体は、ヒトを含む哺乳動物において、免疫機能を調節し、それを正常化する免疫調節作用を有する。ここで「調節」とは、ヒトを含む哺乳動物においてその免疫系を普通のバランスのとれた状態に復旧、維持させる意味に用いることとする。

【0017】従って、ホスホマイシンの鏡像異性体は、まず、免疫不全に罹ったヒトを含む哺乳動物の治療に有用である。

【0018】また、ホスホマイシンの鏡像異性体は、生体内系において、細菌、カビ、マイコプラズマなどによる感染症、敗血症、結核、または癩などの慢性的感染症ならびに急性および慢性的のウイルス性感染症などの疾患の治療に有用である。このような疾患の治療にあたっては抗生物質と組合わせて使用されるのが好ましい。

【0019】更に、ホスホマイシンの鏡像異性体は、抗炎症または抗アレルギー作用を有し、炎症性の疾患またはアレルギー疾患の治療および／または予防に用いることができる。

【0020】更にまた、ホスホマイシンの鏡像異性体は、免疫機能を調節し、正常化させることから、全身性の変形関節炎などのように有害抗体が存在する自己免疫疾患の治療に有用である。また、新生物や臓器移植などのような免疫応答が通常以下である状態の治療にも有用である。

【0021】その作用機序の詳細は定かではないが、ホスホマイシンの鏡像異性体は、細胞免疫を刺激し、また補助することで体内の総合免疫を補助しているのではないかと予想される。より具体的には、ある種のサイトカインの産生を選択的に制御することにより、免疫機能を調節または正常化させているものと考えられる。ホスホマイシンの鏡像異性体によって選択的にその産生が制御されると予測されるサイトカインとしては、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-1 α 、INF α 、INF γ 、IL-2、IL-6、IL-10、GM-CSF、IL-8、GRO α 、MIP-1 α 、RANTESなどが挙げられる。また、ホスホマイシンの鏡像異性体は、ヒトを含む哺乳類において、抗体の産生を増強させることによって、その免疫機能を亢進させているものと予想される。これらサイトカインの産生制御機能および抗体産生増強の作用の詳細については後記する実施例において更に説明されている。

【0022】更にホスホマイシンの鏡像異性体は、バイオフィームの形成を阻害し、または一旦形成されたバイオフィームを破壊する作用を有する。よって、従来、そのバイオフィームの形成がその治療を困難にしていると思われる難治性感染症の治療に有用である。バイオフィームの形成を阻害またはバイオフィームを破壊する作用機序は明らかではないが、ホスホマイシンは細菌に対して、細胞接着因子として知られているセレクトインのリガンドであるsialyl-Lewis^x（sLe^x）が表面抗原として発現するのを抑制することで、菌が組織に接着することおよび菌同士が接着することを阻止しているものと考えられる。

【0023】ホスホマイシンの鏡像異性体によってバイオフィームの形成を阻害または破壊することができる細菌としては、黄色ブドウ球菌、表皮ブドウ球菌、レンサ球菌属、緑膿菌、クレブシエラ属、大腸菌、腸球菌、エンテロバクター属、シントロバクター属、およびセラチア属などの細菌を挙げることができる。

【0024】ホスホマイシンの鏡像異性体を投与することによって、バイオフィームの形成を阻害し、または形成されているバイオフィームを破壊することが出来る。従って、このホスホマイシンの鏡像異性体の投与と同時にまたはそれに続いて適切な抗生物質を投与することで、バイオフィームが関与していると思われる難治性感染症、例えば緑膿菌によるびまん性汎細気管支炎などの慢性の呼吸器感染症、難治性の前立腺炎などの慢性尿路感染性を治療または予防することが出来る。

【0025】本発明において免疫調節剤または抗炎症剤若しくはバイオフィーム形成阻害剤または破壊剤としてのホスホマイシンの鏡像異性体と併用される抗生物質としては、ホスホマイシンに加えて、オフロキサシン、ゲンタマイシン、イミペネム／シラスタチン、セフトキシム、クラリスロマイシンなどのニューキノロン系薬剤、

アミノ配糖体薬剤、 β -ラクタム系薬剤、マクロライド系薬剤などが挙げられる。

【0026】本発明の好ましい態様によれば、ホスホマイシンの鏡像異性体1モルに対し抗菌剤を0.1～5モル程度投与するのが好ましく、より好ましくは0.5～2モルである。

【0027】医薬組成物

ホスホマイシンの鏡像異性体は、そのままヒトを含む哺乳類に投与されてもよいが、通常はそれを有効成分とする医薬組成物として投与されるのが好ましい。

【0028】ホスホマイシンの鏡像異性体を有効成分とする医薬組成物は、経口および非経口（例えば、静注、筋注、皮下投与、直腸投与、経皮投与）のいずれかの投与経路で、ヒトおよびヒト以外の動物に投与することができる。従って、本発明による医薬組成物は、投与経路に応じた適当な剤形とされ、具体的には主として静注、筋注などの注射剤、カプセル剤、錠剤、顆粒剤、散剤、丸剤、細粒剤、トローチ錠などの経口剤、直腸投与剤、油脂性座剤、水性座剤などの種々に調製することができる。これらの各種製剤は通常用いられている賦形剤、増量剤、結合剤、湿潤化剤、崩壊剤、表面活性剤、滑沢剤、分散剤、緩衝剤、保存剤、溶解補助剤、防腐剤、矯味矯臭剤、無痛化剤、安定化剤などを用いて常法により製造することができる。使用可能な無毒性の上記添加剤としては、例えば乳糖、果糖、ブドウ糖、でん粉、ゼラチン、炭酸マグネシウム、合成ケイ酸マグネシウム、タルク、ステアリン酸マグネシウム、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロースまたはその塩、アラビアゴム、ポリエチレングリコール、シロップ、ワセリン、グリセリン、エタノール、プロピレングリコール、クエン酸、塩化ナトリウム、亜硫酸ソーダ、リン酸ナトリウムなどが挙げられる。

【0029】ホスホマイシンの鏡像異性体の投与量は症状や年齢、性別などを考慮して、個々の場合に応じて適宜決定されるが、免疫調節剤または抗炎症剤としては、

通常成人1日当たり約0.1～5g、好ましくは0.2～1g、であり、これを一日1回または数回に別けて投与する。また、バイオフィルム形成阻害または破壊のためには、通常成人1日当たり約0.1～5g、好ましくは0.2～1g、であり、これを一日1回または数回に別けて投与する。さらに、ホスホマイシンの鏡像異性体と、抗生物質とを同時にまたは順次投与する際のホスホマイシンの投与量は前記と同様であってよい。

【0030】

【実施例】

実施例1

敗血症では多くのサイトカイン（特に、TNF、IL-1、およびIL-6）が重要な役割を果たしており、炎症がその病態に大きく関与していると考えられている。ホスホマイシンの鏡像異性体ナトリウム塩の持つ抗炎症作用が、マウス緑膿菌内因性感染モデルを用いた敗血症の病態においてどのような効果を示すかについて次のように検討した。

【0031】SPFのddYマウス（4～6週令、雄）にアンピシリン200mg/kgをあらかじめ投与し、腸管内常在菌を攪乱させた後、緑膿菌D4株を0.45%食塩水に懸濁、飲料水として与え、同菌を腸管内に定着させた。その後、サイクロホスファミド150～200mg/kgを2回投与し（2回目の投与は1回目投与後3日目）、顆粒球減少状態とし、腸管内に定着した緑膿菌による内因性敗血症を生じさせた。2回目のサイクロホスファミド投与の12時間後に、下記の第1表に示される量のホスホマイシンの鏡像異性体ナトリウム塩を腹腔内投与し、さらに24時間間隔で3回腹腔内投与し（すなわち、ホスホマイシンの鏡像異性体ナトリウム塩を合計4回投与した）、マウスの生死を経時的に観察した。なお、試験是一群10匹にて行った。

【0032】結果は、下記の第1表に示される通りであった。

【0033】

第1表

サイクロホスファミド最終投与後8日目以降の生存率

ホスホマイシン鏡像異性体Na塩

10 mg/kg 投与群	60%
2 mg/kg 投与群	80%
0.4mg/kg 投与群	80%
無処置対照群	30%

また、ホスホマイシンナトリウム塩を用いて上記と同様の方法により試験を行い、マウスの生死を経時的に観察した。なお、この実験では一群16匹にて行った。

【0034】結果は、次の第2表に示される通りであった。

【0035】

第2表

サイクロホスファミド最終投与後5日目以降の生存率

ホスホマイシンNa塩

5mg/kg 投与群	55%
無処置対照群	15%

【0036】実施例2

予め投与されたホスホマイシンの鏡像異性体ナトリウム塩の敗血症の病態への影響を次のように検討した。まず、実施例1と同様な方法で緑膿菌を腸管内に定着させ、さらに連日4日間12時間毎に生理食塩水によって5、1、0、2 mg/mouse に調節したホスホマイシンの鏡像異性体ナトリウム塩をそれぞれ腹腔内投与した。そ

の後、サイクロホスファミド150～200mg/kg を2回投与した（2回目の投与は1回目投与後3日目）。その後のマウスの生死を経時的に観察した。なお、実験は一群10匹で行った。

【0037】結果は、次の第3表に示される通りであった。

【0038】

第3表

サイクロホスファミド最終投与後3日以降の生存率

ホスホマイシン鏡像異性体Na塩	
5 mg/kg 投与群	30%
1 mg/kg 投与群	10%
0.2mg/kg 投与群	0%
無処置対照群	0%

【0039】実施例3

ホスホマイシンの鏡像異性体のヒト単球の諸機能に及ぼす効果をin vitroにおいて次のように検討した。ヒト末梢血よりFicoll/Hypaque法にて単核球を分離した後、プラスチックディッシュ付着法により単球を採取した。サイトカインの産生能はLPSとホスホマイシンの鏡像異性体ナトリウム塩との共存下で、24時間培養した後、

その培養上清を採取し、TNF- α 、IL-6の産生をELISAキットにて測定した。ホスホマイシンの鏡像異性体の他、Clarithromycin (CAM)、Dexamethasone (DX) を比較対照薬として用いた。

【0040】結果は次の第4～6表に示されるとおりであった。

【0041】

第4表

ホスホマイシンの鏡像体Na塩の濃度 (μ g/ml)	TNF- α の産生量 (ng/ml)	IL-6の産生量 (ng/ml)
0	2.9	39
1.6	2.0	44
8	1.8	50
40	1.3	55

第5表

CAMの濃度 (μ g/ml)	TNF- α の産生量 (ng/ml)	IL-6の産生量 (ng/ml)
0	2.9	39
1.6	1.7	33
8	1.5	30
40	1.3	27

第6表

DXの濃度 (μ g/ml)	TNF- α の産生量 (ng/ml)	IL-6の産生量 (ng/ml)
0	2.9	39
1.6	1.5	20
8	1.1	11
40	1.0	8

表
表
表

サイトカインの産生能に関し、ホスホマイシンの鏡像異性体は、TNF- α の産生能を強く抑制したが、IL-6産生能には全く抑制効果が認められなかった。このことはホスホマイシンの鏡像異性体によるproinflammatory cytokineの産生能抑制効果が選択的であることを示唆している。

【0042】実施例4

ホスホマイシンの鏡像異性体の抗体産生増強作用を次のように6週令の雄C3H/HeNマウスを5群に分け、各群8匹とし、それぞれに下記の表中の投与量および投与経路でホスホマイシンの鏡像異性体を投与した。投与後5日目、マウスを脱臼殺し、その脾臓を摘出した。摘出した脾臓を脾細胞懸濁液として、プロテインAブランク法 (Eur. J. Immunol. 6:588, 1976) により脾臓内のI

gM抗体産生細胞数を測定した。すなわち、25 μ lの脾臓懸濁液(全容量5ml)、25 μ lのプロテインA被覆ヒツジ赤血球(6倍希釈)、25 μ lモット補体(6倍希釈)、25 μ l抗マウスIgM抗血清(10倍希釈)を同時に0.5%寒天(0.2ml)と混合して、シャーレ内に広げ、カバーガラスをのせて、37℃

で4時間培養した。その後出現する溶血班(PFC)数を測定し、脾臓あたりのIgM抗体産生細胞(溶血班形成細胞)数を算定した。

【0043】結果は、次の第7表に示される通りであった。

【0044】

第7表

投与量	投与経路	IgMPFC \pm S. E. /脾臓
60mg/kg 投与群	腹腔内	87,900 \pm 2,192*
30mg/kg 投与群	腹腔内	102,250 \pm 3,281*
60mg/kg 投与群	経口	116,850 \pm 5,708*
30mg/kg 投与群	経口	147,900 \pm 6,413*
対照群		48,975 \pm 2,924**

表中、*)はt検定において5%の危険率で有意差あり、

**)は平均値 \pm 標準誤差である。

【0045】実施例5

緑膿菌バイオフィルムを試験管内において公知の方法(感染症、21, 161, 1991)で形成させた。すなわち、兎の血漿を添加した生理食塩水中にテフロン片を入れ、これに緑膿菌を接種した。37℃で6日間放置するとテフロン表面に緑膿菌バイオフィルムが形成された。これに、ホスホマイシンの鏡像異性体ナトリウム塩を50 μ g/ml、オフロキサシンまたはゲンタマイシンを10 μ g/mlになるように添加し、そのバイオフィルム内の生菌数の変化を測定した。

【0046】その結果は、図1に示される通りであった。

【0047】実施例6

化膿レンサ球菌表面のsl^{ex}抗原に対するホスホマイシンの鏡像異性体の作用をELISA法によって次のように検討した。

【0048】化膿レンサ球菌(*Streptococcus pyogenes*) 19615株をブレインハートインフュージョン液体培地(BHI, Difco, Detroit, U.S.A.)にて18時間、37℃、5%CO₂の条件下にて培養した後、ダルベッコのリン酸緩衝化生理食塩水(PBS)で遠心洗浄した。660nmにおける濁度を各菌株ともに0.6(2.0 \times 10⁸ cfu/ml)に調整した後、ホスホマイシンの鏡像異性体ナトリウム塩を10 μ g/mlになるよう添加した後、1時間、37℃、5%CO₂の条件下にて培養

し、供試菌液とした。この菌液の50 μ lをELISAプレート(Corning Glass Works No.25801, New York, U.S.A.)の各ウェルに分注した後、乾固吸着した。次に1.0%牛血清アルブミンを含むPBS(1%BSA-PBS)300 μ lを各ウェルに添加した後、室温にて60分放置した。マイクロプレートウォッシャー(Model 1550, Biorad Lab., Richmond, U.S.A.)を用いて洗浄した後、抗sl^{ex}モノクローナル抗体(mAb SNH-3)(200 μ g/100 μ l、100倍希釈液、和光純薬)を加え室温にて120分間反応させた。再び洗浄した後、西洋ワサビペルオキシダーゼ標識ヤギ抗マウスIgM(Kirkegaard & Perry Labs., Inc., Gaithersburg, U.S.A.)(2000倍希釈液)50 μ lを各ウェルに入れ、室温にて60分反応させた。再度同様に洗浄した後、H₂O₂と2,2'-azino-di-3-ethylbenzothiazoline-(6)-sulfonate(ABTS, Kirkegaard & Perry Labs., Inc., Gaithersburg, U.S.A.)の混合液を50 μ l入れ、室温にて反応させた。発色の強さを、414nmにおける吸光度としてELISAリーダー(Model 2550, Biorad Lab., Richmond, U.S.A.)にて測定した。対照として、抗原、第2抗体、および基質混合液を反応させた。

【0049】結果は、次の第8表に示されるとおりであった。

【0050】

第8表

	sl ^{ex} 発現強度(O.D. 414nm)
ホスホマイシン鏡像異性体添加群	0.58 \pm 0.036
対照群	0.86 \pm 0.021

【0051】実施例7

化膿レンサ球菌バイオフィルム表面のsl^{ex}抗原に対するホスホマイシンの鏡像異性体の作用を蛍光抗体法によって次のように検討した。化膿レンサ球菌(*Streptococcus pyogenes*) 19615株をブレインハートインフュージョン液体培地(BHI, Difco, U.S.A.)にて18時間、3

7℃、5%CO₂の条件下にて培養した後、ダルベッコのリン酸緩衝化生理食塩水(PBS)にて遠心洗浄した。新鮮ブレインハートインフュージョン液体培地にて2.0 \times 10⁷ cfu/mlに調整した後、この菌液にセルデスク(SUMILON)を浸漬し、37℃で4日間培養し、セルデスク表面にバイオフィルムを形成させた。これにホ

スホマイシンの鏡像異性体ナトリウム塩を10 μ g/mlになるように添加し、1時間作用させた。このセルデスクを洗浄した後、抗sl⁶²モノクローナル抗体(mAbSNH-3)と室温にて1時間反応させた。再び洗浄した後、フルオレセインイソチオシアネート標識ヤギ抗マウスIgMを加え、室温にて1時間反応させた。再度同様に洗浄した後、ACAS570レーザーサイトメーターを使用し、488nmにてsl⁶²の発現強度を測定した。対照として、ホスホマイシン鏡像体を添加しないセルデスクについて測定した。

【0052】対照ではセルデスク表面上の蛍光は比較的全面的に認められ、その強度は非常に強かった。一方、ホスホマイシン鏡像体で作用したセルデスク表面では蛍光強度は弱く、sl⁶²の発現が減弱していた。

【0053】実施例8

ホスホマイシンの鏡像異性体の最少阻止濃度(MIC)を、常法に従い測定した。対照としてホスホマイシンのMICも測定した。その結果は、次の第9表に示される通りである。

【0054】

第9表

菌 株	MIC (μ g/ml)	
	FOM (+)	FOM
S.aureus 209P JC-1	>200	25
S.epidermidis ATCC14990	>200	3.13
E.coli NIHJ JC-2	>200	25
C.freundii GN346/16	>200	6.25
S.marcescens No.1	>200	3.13
P.aeruginosa GN10362	>200	3.13

表中、FOM (+) : ホスホマイシン鏡像異性体、
FOM : ホスホマイシン。

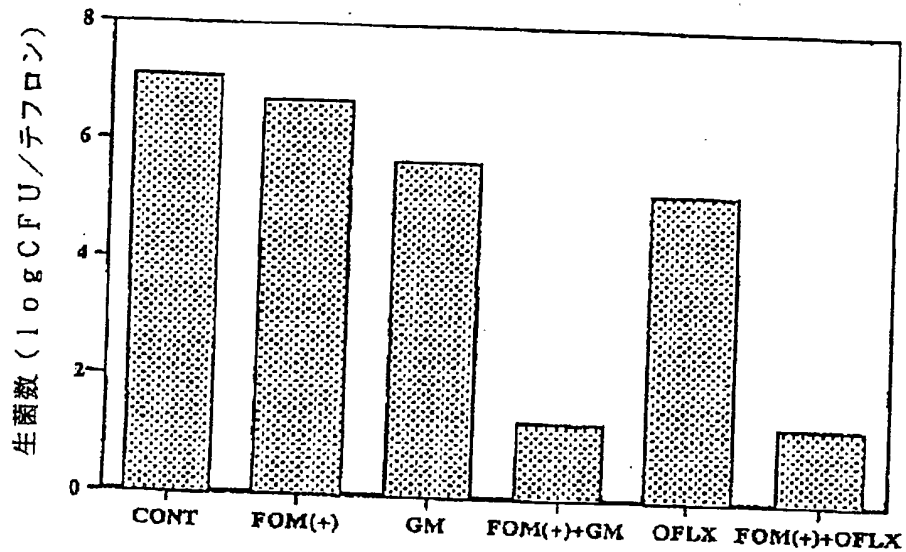
【0055】急性毒性試験

ホスホマイシンの鏡像異性体ナトリウム塩の、マウス(雄)腹腔内投与におけるLD₅₀は2000mg/kgであり、その毒性はホスホマイシンナトリウム塩と同様に極めて低かった。

【図面の簡単な説明】

【図1】ホスホマイシンの鏡像異性体ナトリウム塩と、オフロキサシンまたはゲンタマイシンを併用した場合のバイオフィーム内の生菌数の変化を示す図である。

【図1】



CONT : 対照

FOM(+): ホスホマイシンの鏡像異性体

GM : ゲンタマシ

OFLX : オフロキサシン

フロントページの続き

(51)Int. Cl.⁶

// C07M 9:00

識別記号

庁内整理番号

FI

技術表示箇所

(72)発明者 原 哲 郎

神奈川県横浜市港北区師岡町760番地 明
治製薬株式会社薬品総合研究所内

(72)発明者 尾 本 捷 二

神奈川県横浜市港北区師岡町760番地 明
治製薬株式会社薬品総合研究所内

(72)発明者 小 林 宏 行

東京都西多摩郡羽村町川崎1221-5

(72)発明者 三 宅 洋 一 郎

徳島県徳島市住吉3丁目4番20号

(72)発明者 弘 田 克 彦

徳島県徳島市川内町榎瀬512-54

(72)発明者 石 坂 重 昭

奈良県大和郡山田町山田3-6